E. Menzel

1971

Aus der Frauenklinik der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. H. Limburg

UNTERSUCHUNG ZUR HEMMUNG DER GLUCOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE (G-6-PDG) DURCH STEROIDE

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der
DOKTORWÜRDE
DER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
vorgelegt von

ERNA MENZEL

Dekan: Prof. Dr. med. H. Kulenkampff
Referent: Priv. Doz. Dr. med. W. Rindt

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promotionsprüfung am 1o. 12. 1971. abgelegt.

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	Seite	1
MATERIAL	"	18
METHODIK	"	19
VERWENDETE ABKÜRZUNGEN UND TRIVIALNAMEN	"	23
ERGEBNISSE	"	25
DISKUSSION	"	35
ZUSAMMENFASSUNG	"	51
LITERATURVERZEICHNIS	"	52
DANKSAGUNG	"	61
LEBENSLAUF	"	62

EINLEITUNG

Seit einigen Jahren ist bekannt, daß gewisse Steroide einen inhibitorischen Effekt auf das erste Enzym im Pentose-Phosphat-Zyklus (PPZ), nämlich die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDG) ausüben. So berichtete Mc KERNS (30) 1959 über eine Hemmung der adrenalen G-6-PDG durch Steroide. MARKS und Mitarbeiter (28,29) bestätigen diese Befunde mit einer G-6-PDG aus Erythrozyten. LEVY (25) untersuchte die Hemmung der G-6-PDG aus Milchdrüsengewebe laktierender Ratten, BETZ und WARREN (5) an menschlicher Plazenta. Während sich die meisten Untersuchungen dieser Art bislang vorwiegend auf einige freie Steroide beschränkten - Steroid-Sulfate erwiesen sich als unwirksam (31,32,40) - konnten OERTEL und Mitarbeiter mit Steroid-Sulfatid (34-36) gleichfalls eine deutliche Hemmung nachweisen (31,32,39-41). Bei Versuchen mit G-6-PDG aus menschlichen Erythrozyten (39) bzw. aus Leber und Ovar (40,41) fand sich sogar eine deutliche Überlegenheit dieses lipophilen Sulfokonjugats gegenüber dem freien Steroid hinsichtlich der Inhibition.

In Fortsetzung dieser Experimente sollte in der hier vorliegenden Arbeit einmal der Einfluß von freiem Dehydroepiandrosteron (DHEA) und seiner Konjugate

auf die G-6-PDG aus menschlichem Hirn untersucht werden und zum anderen der Einfluß verschiedener C_{19}-, C_{21}-Steroide auf die G-6-PDG aus menschlicher Plazenta. Gleichzeitig galten diese Versuche der Aufklärung von Zusammenhängen zwischen der Struktur eingesetzter Steroide und ihrer Aktivität als Inhibitor.
Dem speziellen Teil dieser Versuche seien einige allgemeine Erläuterungen vorangestellt, die sich mit der Wirkung von Enzymen, insbesondere der G-6-PDG, sowie mit Steroiden und ihren Konjugaten befassen.

Enzyme (1,2,9,13,16) sind hochmolekulare Eiweißkörper, die von der lebenden Zelle gebildet werden und als Biokatalysatoren wirken. Chemisch gesehen gehören sie in die Gruppe der Proteine oder Proteide. Sie bestehen aus einem hochmolekularen, thermolabilen Protein - auch als Apoferment bezeichnet - und einer niedermolekularen, thermostabilen, abspaltbaren prosthetischen Gruppe, dem Coferment. Beide zusammen bilden das Holoenzym:

Apoferment + Coferment → Holoferment

Dem Proteinanteil wird eine Substrat- und eine Wirkungsspezifität zugeschrieben. Die Substratspezifität besagt, daß das Enzym nur ein bestimmtes Substrat umsetzen kann:

"Das Enzym paßt wie der Schlüssel zum Schloß".

Dieselbe prosthetische Gruppe kann oftmals verschiedene Reaktionen katalysieren. Die im Apoferment lokalisierte Wirkungsspezifität entscheidet dann, welche Reaktion eintreten wird. Nur für diese eine Reaktion wird die Aktivierungsenergie so weit herabgesetzt, daß die zugrunde liegende Reaktion ablaufen und sich ein entsprechendes Gleichgewicht schneller einstellen kann.

Diese Beeinflussung eines Reaktionsgleichgewichtes bedeutet die eigentliche wichtige Eigenschaft der Enzyme: nämlich die Biokatalyse. Während im Sinne der klassischen Chemie Katalysatoren Stoffe sind, die einen Reaktionsablauf beschleunigen, ohne selbst eine Molekülveränderung zu erfahren, besitzen Biokatalysatoren nur die Fähigkeit zur Reaktionsbeschleunigung. Sie nehmen also an der von ihnen katalysierten Reaktion teil und müssen in einer zweiten Reaktionsfolge wieder regeneriert werden, um dann erneut zur Verfügung zu stehen.

Neben der Substrat- und Wirkungsspezifität sei noch die stereochemische Spezifität angeführt. Sie besagt, daß Enzyme in einem racemischen Gemisch des Substrates nur die natürlich vorkommende Komponente angreifen.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der katalysatorischen Reaktion ist als Stoffumsatz pro Zeiteinheit definiert,

wobei als Einheit die Enzymmenge gilt, die unter optimalen, definierten Bedingungen eine bestimmte Substratmenge umsetzt. Neuerdings wird bei der Charakterisierung von Enzymen auch von molarer Wirksamkeit, Umsatzzahl, Wechselzahl oder turn-over-number gesprochen. Es ist dies die Zahl von Substratmolekülen, die je Minute durch ein Molekül des Fermentes umgesetzt werden. Was den Reaktionsmechanismus betrifft, so bilden Enzym und Substrat zunächst einen Enzym-Substrat-Komplex:

$$\text{Enzym} + \text{Substrat} \rightleftharpoons \text{Enzym-Substrat-Komplex}$$

$$E + S \rightleftharpoons E\,S$$

Für diese Reaktionsgleichung gilt das Massenwirkungsgesetz mithin also die Beziehung:

$$\frac{[E] \cdot [S]}{[ES]} = K_s$$

Wenn man bei gegebener Enzymmenge das Substrat schrittweise erhöht, so wird mehr und mehr Enzym-Substrat-Komplex entstehen und die Reaktionsgeschwindigkeit ansteigen. Das Maximum an Geschwindigkeit ist erreicht, wenn alles E im ES-Komplex gebunden ist, also bei Sättigung des

Enzyms. Da aber bei graphischer Darstellung die Kurve der maximalen Geschwindigkeit einen asymptotischen Verlauf zeigt, kann die maximale Substratkonzentration nicht genau abgelesen werden, daher legte man sich auf die halbmaximale Geschwindigkeit als Bezugspunkt fest. Bei halbmaximaler Geschwindigkeit liegt die gleiche Menge Enzym in freier wie in gebundener Form im ES-Komplex vor. In der vorstehenden Gleichung heben sich dadurch E und ES auf und es ergibt sich:

$$S \text{ (halbmaximale Geschwindigkeit)} = K_s$$

Letztere Konstante wird als sogenannte Michaeliskonstante bezeichnet. Sie gibt die Substratkonzentrationen an, bei der die Hälfte des Enzyms gesättigt ist. Gleichzeitig kennzeichnet sie die Affinität des Enzyms für das Substrat: Eine hohe Michaeliskonstante bedeutet eine geringe Affinität, eine kleine hingegen eine starke Affinität des Enzyms für das Substrat.

Enzyme entfalten ihre stärkste Aktivität bei bestimmten pH und bestimmter Temperatur. Die Optima differieren von Enzym zu Enzym. Als Beispiele seien die Verdauungsfermente des sauren Magens und die des alkalischen Darmtraktes genannt. Tiefe Temperaturen bringen im Allge-

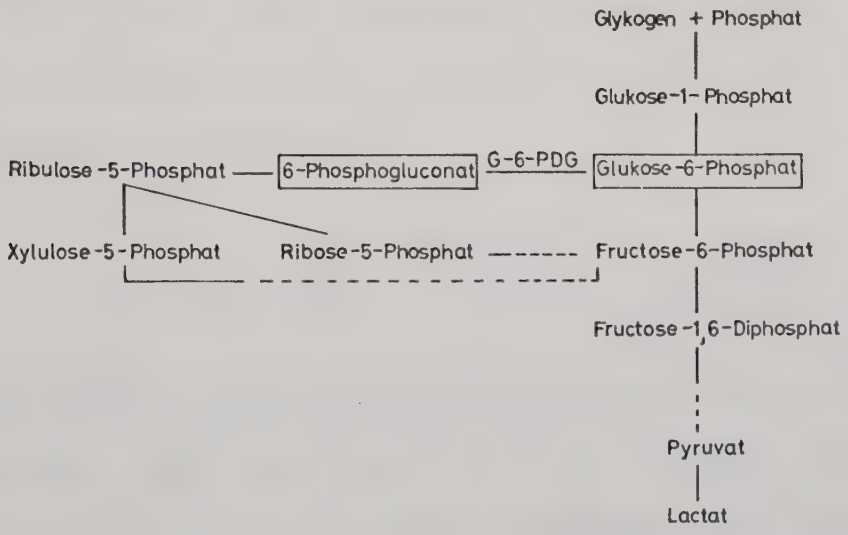
meinen Enzymaktivitäten zum Erliegen, während hohe Temperaturen irreversible Schäden verursachen können. Auch Druck und Strahlenenergie spielen eine, wenn auch untergeordnete Rolle. Enzymaktivitäten lassen sich überdies durch weitere Faktoren beeinflussen, wie etwa durch Aktivatoren und Inhibitoren, die auch als Effektoren bezeichnet werden. Bei den Aktivierungs-Beschleunigungen kann es sich einmal um Überführung von inaktiven Proenzymen in die eigentlichen aktiven Fermente handeln, oder aber um die sogenannte Enthemmung, d.h. Entfernung hemmender Begleitstoffe am Enzym, sodaß das Ferment nun seine Wirkung entfalten kann (Demaskierung). Aktivatoren können außerdem als Protektoren die Wirkung von Inhibitoren ausschalten.

Inhibitoren, die in ihrer Struktur dem Substrat ähneln, konkurrieren mit letzterem um die Bindung am Enzym. Bei hoher Konzentration des Hemmstoffes kann das eigentliche Substrat schließlich völlig verdrängt und die Reaktion zum Erliegen gebracht werden. Dieser Ablauf folgt dem Massenwirkungsgesetz, d.h. durch Erhöhung der Substrat-Konzentration kann der Hemmstoff wiederum vom Enzym weggedrängt werden. Es handelt sich bei dieser Art von Hemmung um eine k o m p e t i t i v e Hemmung. Die n i c h t - k o m p e t i t i v e Hemmung hingegen kann

durch eine Erhöhung der Substratmenge nicht aufgehoben werden, da der Hemmstoff durch elektrostatische Ladungsverschiebung an einer anderen Stelle des Enzyms dessen Konformation entscheidend verändert. Die Anlagerung des Inhibitors an das Enzymmolekül erschwert entweder die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes oder seine Dissoziation zum Reaktionsprodukt. Die nicht-kompetitive Hemmung hat im physiologischen Bereich eine große Bedeutung als Rückkoppelung oder feed-back inhibition, d.h. das Endprodukt einer Stoffwechselkette kann inhibitorisch die Enzymaktivität am Beginn der Kette beeinflussen. Je nach Konzentration des Endproduktes wird also die Bremsung oder die Entstehung des Endproduktes gesteuert. Zu den nicht-kompetitiven Hemmstoffen im weiteren Sinne gehören noch die Destruktoren, die die Fermente zerstören und damit ihre biologische Aktivität irreversibel aufheben.

Nach der Betrachtung der Enzyme im allgemeinen soll nun näher auf das in dieser Arbeit interessierende Enzym, nämlich die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDG) eingegangen werden. Der Glucose-Abbau kann sich über zwei verschiedene Wege vollziehen. Der erste und bedeutendere ist als Embden-Meyerhoff-Parnas Schema bekannt,

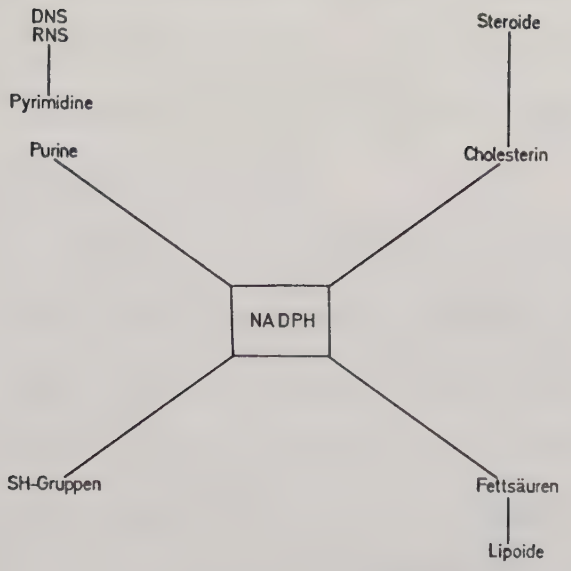
während der zweite als Pentose-Phosphat-Zyklus (PPZ) oder auch als Warburg-Dickens-Horecker-Schema bezeichnet wird (2,9,19). Folgende Darstellung mag dies verdeutlichen:



Wie man ersieht, steht die G-6-PDG an erster Stelle des PPZ und entscheidet solchermaßen, ob "aktivierte Glucose" über den Pentose-Phosphat-Weg abgebaut wird oder nicht. Die Bedeutung dieses Zyklus liegt nicht nur in der Bildung von Pentosen, die der Organismus für den Aufbau der wichtigen Ribo-(RNS) und Desoxyribonukleinsäure (DNS) und somit für die Proteinsynthese benötigt, sondern auch in der Bereitstellung von $NADPH^+$. Ist doch dieses Coenzym ein wichtiger Wasserstoffdonator für viele Reaktionen im menschlichen Körper:

$$\text{G-6-P} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G-6-PDG}} \text{6-PG} + \text{NADPH}^+$$

Hieraus kann gefolgert werden, daß zur Aufrechterhaltung des Zyklus außer der Anwesenheit von G-6-PDG auch die stetige Oxydierung des $NADPH^+$ notwendig ist. Diese Möglichkeit bieten z.B. der Fettsäureabbau oder die Atmungskette. $NADPH^+$ ist nicht nur ein wichtiger H_2-Donator im Fettsäuremetabolismus, sondern wird ebenso zur Synthese von Steroiden und deren Umbau benötigt. Überdies erlangt es eine Bedeutung für die Spaltung der Disulfid-Brücken in Proteinen oder Proteiden (9).



Die Bedeutung des NADPH im Stoffwechsel

Abbildung 2 soll die Bedeutung des NADPH im Organismus veranschaulichen.

WARBURG und CHRISTIAN (50) konnten die G-6-PDG aus Erythrozyten und Hefe isolieren. Später wurde sie in nahezu allen tierischen und menschlichen Geweben nachgewiesen (26) und zwar außer in allen Formbestandteilen

des Blutes, im Fettgewebe, in der laktierenden Mamma, in Leber, Pankreas, Niere, Lunge, Gehirn, Plazenta, Skelett- und Herzmuskulatur, sowie in geringen Mengen im Serum. Zu erwähnen ist der recht erhebliche G-6-PDG-Gehalt in malignen Tumoren.

1956 berichteten CARSON (10) in den USA und WALLER und LÖHR (49) in Europa erstmals über ihre Beobachtungen eines Zwischenfermentmangels in den Erythrozyten von Patienten, die auf Antimalaria-Mittel mit hämolytischen Krisen reagierten. 1958 konnten LARIZZA und Mitarbeiter (23) den gleichen Enzymdefekt in den Erythrozyten von Favismuskranken in Italien, besonders Sardinien nachweisen. Beim Favismus handelt es sich um eine im Mittelmeer familiär auftretende, angeborene Überempfindlichkeit gegenüber einer bestimmten Sorte Bohnen. Bedingt ist diese Abnormität durch ein Fehlen oder zumindest einen Funktionsmangel der G-6-PDG. Diese wahrscheinlich rezessiv, geschlechtsgebundene, erbliche Anomalie löst bei ca. 5-10% der Einwohner Sardiniens, des Iraks, Israels und des Irans beim Genuß von Saubohnen oder nach Applikation von Antimalaria-Mitteln eine Hämolyse aus. Neuere Untersuchungen von GRIGNANI (17) haben wahrscheinlich gemacht, daß die G-6-PDG in den Erythrozyten bei Favismus

praeformiert vorhanden ist, jedoch in inaktiver Form vorliegt. Ein Zusatz von gewaschenen Stromata normaler Erythrozyten zu Hämolysaten von Favismus-Erythrozyten aktiviert die G-6-PDG in diesen Hämolysaten von Favismus auf fast normale Werte. Es scheint sich somit um das Fehlen eines Aktivators der G-6-PDG zu handeln. Doch auch andere exogene Faktoren wie Sulfonomide, Phenacetine und Butazolidin können zu hämolytischen, akuten Schüben führen (33). Beim Icterus gravis neonatorum sowie bei einigen chronischen hämolytischen Anämien infolge G-6-PDG-Mangels scheint der Mangel an reduziertem Glutathion Bedeutung zu haben (33).

Eine Erhöhung der G-6-PDG ist Ausdruck eines herabgesetzten Durchschnittsalters der Erythrozyten-Population, denn Reticulozyten und junge Erythrozyten benötigen mehr Glucose. Mit zunehmendem Zellalter wird die G-6-PDG geringer. Somit ist die G-6-PDG-Aktivität ein Maß für das Durchschnittsalter der Erythrozyten (33). Die verstärkte Erythropoese könnte auch der Grund für die bei Schilddrüsen-Überfunktion auftretende Erhöhung der G-6-PDG-Aktivität sein (6).

Es kann zu einer Erhöhung der G-6-PDG im Erythrozyten kommen bei der Perniziosa, wobei die Megalozyten

praeformiert vorhanden ist, jedoch in inaktiver Form vorliegt. Ein Zusatz von gewaschenen Stromata normaler Erythrozyten zu Hämolysaten von Favismus-Erythrozyten aktiviert die G-6-PDG in diesen Hämolysaten von Favismus auf fast normale Werte. Es scheint sich somit um das Fehlen eines Aktivators der G-6-PDG zu handeln. Doch auch andere exogene Faktoren wie Sulfonomide, Phenacetine und Butazolidin können zu hämolytischen, akuten Schüben führen (33). Beim Icterus gravis neonatorum sowie bei einigen chronischen hämolytischen Anämien infolge G-6-PDG-Mangels scheint der Mangel an reduziertem Glutathion Bedeutung zu haben (33).

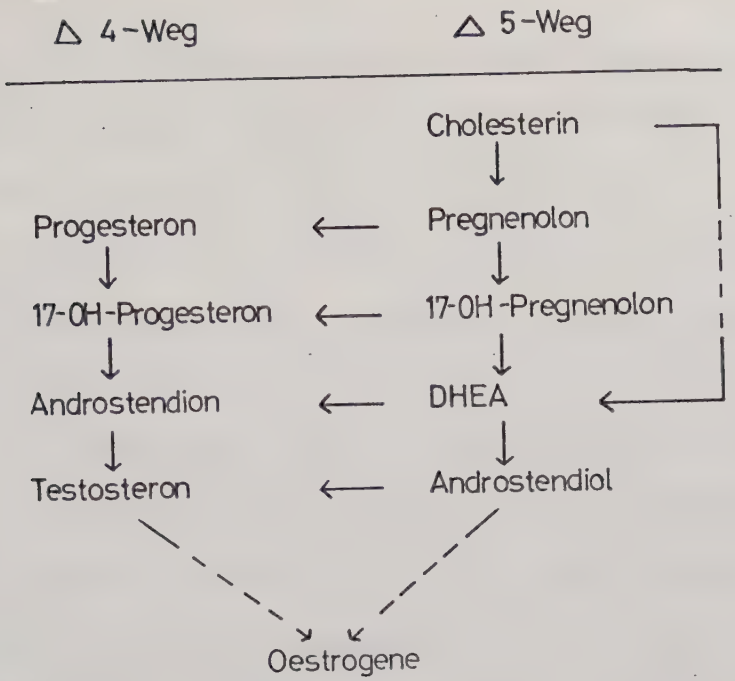
Eine Erhöhung der G-6-PDG ist Ausdruck eines herabgesetzten Durchschnittsalters der Erythrozyten-Population, denn Reticulozyten und junge Erythrozyten benötigen mehr Glucose. Mit zunehmendem Zellalter wird die G-6-PDG geringer. Somit ist die G-6-PDG-Aktivität ein Maß für das Durchschnittsalter der Erythrozyten (33). Die verstärkte Erythropoese könnte auch der Grund für die bei Schilddrüsen-Überfunktion auftretende Erhöhung der G-6-PDG-Aktivität sein (6).

Es kann zu einer Erhöhung der G-6-PDG im Erythrozyten kommen bei der Perniziosa, wobei die Megalozyten

besonders reich an G-6-PDG sind. Bei Eisenmangel und bei gewissen hämolytischen Anämien sowie bei Patienten mit dekompensierter Lebercirrhose ist ebenfalls die G-6-PDG in den Erythrozyten erhöht. Die G-6-PDG bei einer B_{12} behandelten Perniziosa bleibt monatelang hoch.

Auch beim Herzinfarkt kommt nach LAUDAHN (24) der G-6-PDG eine gewisse diagnostische Bedeutung zu. Nach seinen Erfahrungen steigt die Aktivität der G-6-PDG am Ende der ersten Woche nach dem Infarkt an, d.h. wenn Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Lactatdehydrogenase (LDH) bereits wieder normal sind. Unterschiedliche Enzym-Aktivitäten wurden bei den verschiedenen Formen der Schizophrenie gefunden (11).

Aus dem Gesagten wird klar, welche Bedeutung solche Steroide im Stoffwechsel erlangen können, die G-6-PDG hemmend beeinflussen. Zuvor sei aber noch kurz allgemein auf den Steroid-Metabolismus eingegangen (2,9,15,38,52). Auch hier soll ein Schema dem besseren Verständnis dienen:



Alle Steroide leiten sich vom Cholesterin ab. Als ersten wichtigen Metaboliten verzeichnen wir das Pregnenolon. Dieses kann auf zwei Wegen metabolisiert werden, die sich durch die Lage der Doppelbindungen im Steroid-Molekül unterscheiden und daher als Δ 4-Weg und Δ5-Weg bezeichnet werden. Im Verlauf des Δ4-Weges entstehen aus Pregnenolon Progesteron und 17-OH-Progesteron, während auf dem Δ 5-Weg zunächst 17-OH-Pregnenolon gebildet wird.

Diese C-21-Steroide erfahren sodann eine Abspaltung ihrer Seitenkette unter Entstehung von C-19-Steroiden. Auf dem Δ 5-Weg finden wir das für diesen Versuch wichtige Dehydroepiandrosteron (DHEA), das als "Vorhormon" (BAULIEU) (3) für Androgene und Oestrogene gelten kann. Es sei bemerkt, daß DHEA wahrscheinlich auch direkt aus dem Cholesterin entstehen kann (8,18). Vom DHEA leiten sich einmal Androstendiol als weiterer Δ5-Metabolit ab, sowie Δ 4-Androstendion, das sich aber ebenso auf dem Δ 4-Weg aus 17-OH-Progesteron bilden kann. Δ5- und Δ 4-Metaboliten münden gemeinsam im Testosteron, aus dem über einige Zwischenstufen Oestrogene hervorgehen können.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß die so bedeutenden Hormone der Nebennierenrinde wie Cortisol, Cortison, Cortexon, Corticosteron und Aldosteron als C-21-Steroide aus Pregnenolon und Progesteron entstehen.

Neben den freien Steroiden existieren noch ihre Konjugate. Unter Steroid-Konjugaten versteht man z.B. Ester von Steroiden und Schwefelsäure oder Sulfatidsäure und Äther von Steroiden und Glucuronsäure, die als Steroid-Sulfate, Steroid-Sulfatide und Steroid-Glucuronoside bezeichnet werden. Sind Steroid-Sulfate und Steroid-

Glucuronoside hinlänglich bekannt, so muß zu Steroid-Sulfatiden einiges bemerkt werden.

Während Steroid-Sulfate und -Glucuronoside wasserlösliche Substanzen sind, handelt es sich bei Steroid-Sulfatiden um lipophile Verbindungen. Man kann sie als Diglyceridester von Steroid-Schwefelsäure auffassen, oder als Steroidester der Sulfatidsäure = Diglycerid-schwefelsäure. Dank der lipophilen Eigenschaften kann das Steroid-Sulfatid durch Lipoidmembranen penetrieren. Es ist daher im Gegensatz zum wasserlöslichen Steroid-Sulfat z.B. den durch Lipoidmembranen getrennten Enzymsystemen der Mitochondrien oder anderer Zellbestandteile zugänglich. Nach OERTEL (37) besitzt der menschliche Organismus die Fähigkeit, Steroid-Sulfat rasch in Steroid-Sulfatid überzuführen.

Der Autor sieht im Sulfatid nicht nur die wichtigste Konjugationsform eines Steroids, sondern auch eine "Speicherform", wie aus den gegenüber anderen Konjugaten langen Halbwertszeiten zu entnehmen ist (51). Ebenso wie andere Steroid-Konjugate werden auch die Steroid-Sulfatide z.T. direkt metabolisiert.

BAULIEU (3) unterschied als erster zwischen einem indirekten und direkten Metabolismus und bezog sich

damit auf Steroid-Konjugate insbesondere auf die Steroid-Sulfate. Unter direktem Metabolismus versteht man den Abbau von konjugierten Steroiden ohne Abspaltung der Sulfatgruppe, während beim indirekten Metabolismus das Steroid-Konjugat erst einer Hydrolyse unterliegt und das freigesetzte Steroid anschließend weiter metabolisiert wird.

Nachdem sich, wie eingangs erwähnt, etliche Autoren mit dem hemmenden Einfluß von Steroiden auf G-6-PDG beschäftigten, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von DHEA und seinen Sulfokonjugaten auf die G-6-PDG im menschlichen Hirn untersucht werden. Ist doch auch in diesem Gewebe ein Steroid-Stoffwechsel sicherlich von Bedeutung (37). So ist es bekannt, daß menschliches Gehirn und peripheres Nervengewebe größere Mengen an Cholesterin enthalten. Desweiteren konnten TOUCHSTONE und andere (14, 46-48) Corticosteroide in Nerven, Hirn und Liquor nachweisen. Außerdem demonstrierten KNAPSTEIN und Mitarbeiter (22), daß freie Steroide rascher im Blut von Hirngewebe resorbiert werden als deren Sulfate. OERTEL und Mitarbeiter (42) konnten 30 Minuten nach i.v. Injektion von markiertem DHEA-Sulfat Steroid-Sulfokonjugate im Liquor nachweisen.

Was die Spezifität der Steroide hinsichtlich einer Hemmung von G-6-PDG betrifft, so waren derartige Untersuchungen mit der geringen Menge verfügbaren Hirngewebes nicht möglich. Für diese Experimente wurde daher Plazentagewebe benutzt.

Material

Die zur Bestimmung der G-6-PDG notwendigen Puffersubstanzen und Substrate wie TÄA, NADP und G-6-P lieferte die Fa. Böhringer, Mannheim; das für die Enzymanreicherung benötigte Kalzium-Phosphat-Gel die Fa. Serva, Heidelberg. Freies DHEA und DHEA-Sulfat wurden von der Fa. Mann-Research Laboratories, Inc. New York bezogen, während DHEA-Sulfatid nach der von OERTEL beschriebenen Methode (34) hergestellt wurde. Die restlichen Steroide wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof.Dr.L.Starka, Prag, Tschechoslowakei überlassen.

Methodik

Frisches, nicht pathologisches Hirngewebe eines Patienten, der wegen eines Glioblastoms einer Operation unterzogen wurde, wusch man in 0,9% NaCl/0.025% EDTA, um anhaftende Blutreste weitgehend zu entfernen. Anschließend wurde das Gewebe gewogen und in 5 ml dieser Lösung pro g Gewebe homogenisiert. Nach Zentrifugieren des Homogenats für 20 Minuten bei 15000 g und 0^{o} C wurde der Überstand sorgfältig dekantiert. Diese Versuchsanordnung lehnt an die von LÖHR und WALLER (26) angegebenen Methodik an.

Zwecks Anreicherung bzw. Reinigung der G-6-PDG unterwarf man den Überstand einer Ammonium-Sulfat-Fällung Hierzu wurde der im ersten Arbeitsgang gewonnene Überstand mit 19,4 g Ammonium-Sulfat pro 100 ml versetzt, was einer 35% Sättigung entspricht. Ausgefällte Proteine wurden durch Zentrifugieren für 30 Minuten bei 25 000 g und Dekantieren entfernt. Den Überstand versetzte man mit 11,8 g Ammonium-Sulfat pro 100 ml Lösung (=55% Sättigung), zentrifugierte bei 18000 g für 8 Minuten und dekantierte den Überstand. Der Rückstand, der die G-6-PDG enthielt, wurde in 1 ml 0.05 M Triäthanolamin/0.005M EDTA-puffer von pH 7.6 gelöst und der Messung wie unten

beschrieben unterzogen.

Da die auf diese Weise gewonnenen Enzym-Aktivitäten nur für eine geringe Anzahl von Versuchen ausreichten, für die Prüfung von zahlreichen C_{19}-, C_{21}- Steroiden aber größere Mengen G-6-PDG notwendig waren, isolierte man zusätzlich G-6-PDG aus frischer menschlicher Plazenta. Die Reinigung des Enzyms erfolgte dabei nach der von MARKS und Mitarbeitern (29) beschriebenen Methode:

Frische Plazenta wurde mit eiskalter physiologischer Na Cl gespült und gewaschen, um möglichst viel Blut zu entfernen. Nach Wiegen wurde das Gewebe in 1 ml 0.9% Na Cl / 0.025% EDTA Lösung pro g Gewebe wie bei der Aufarbeitung des Gehirns homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der Überstand wurde sodann bei 35% Sättigung mit Ammonium-Sulfat für 30 Minuten bei 25 000 g zentrifugiert. Den Überstand sättigte man zu 55% mit Ammonium-Sulfat und gewann durch Zentrifugieren bei 18 000 g über 8 Minuten das enzymhaltige Praezipitat. Dieses wurde in 20 ml Triäthanolamin aufgenommen und erneut einer 8 minütigen Zentrifugation bei 4 000 g unterzogen. Der Überstand entsprach der Ammonium-Sulfat-Fraktion I. Dieser Fraktion wurden pro ml 14 ml einer

Kalzium-Phosphat-Gel-Suspension hinzugefügt. Nach 10 Minuten zentrifugierte man bei 18 000 g den Niederschlag ab und eluierte ihn 3 x mit insgesamt 10 Volumen 0,1 M Phosphat-Puffer von pH 7,6 (bezogen auf das Volumen der Fraktion I). Das Gel-Eluat wurde erneut mit Ammonium (16,4 g Ammonium-Sulfat pro 100 ml Eluat) versetzt (=30% Sättigung), das Praezipitat bei 18 000 g abzentrifugiert und der Überstand nach 50% Sättigung mit Ammonium-Sulfat erneut bei 18 000 g zentrifugiert. Der Niederschlag, der das gesuchte Enzym in einer etwa 250-fachen Anreicherung enthielt, wurde in TÄA-EDTA-Puffer gelöst und für die Versuche benutzt.
Folgende Versuchsanordnung wurde getroffen:

A. Messung der G-6-PDG-Aktivität:
   I. ohne Steroid,
   II. mit Steroid in verschiedenen Konzentrationen.

B. Messung der G-6-PDG-Aktivität unter Veränderung der G-6-P-Konzentration:
   I. ohne Steroid,
   II. mit konstanter Steroid-Konzentration (10^{-5}M).

C. Messung der G-6-PDG-Aktivität unter Veränderung der NADP-Konzentration (Nur bei Hirngewebe durchgeführt):

I. ohne Steroid,

II. mit konstanter Steroid-Konzentration (10^{-5}M).

In die Küvetten wurde pipettiert:

1. 3,0 ml TÄA-Puffer
2. 0,05 ml Enzym-Lösung
3. 0,1 ml 10^{-3} M NADP bzw. in einer entsprechend C veränderten Konzentration
4. 0,02 ml Steroid in Dioxan (Im Leerversuch nur Dioxan).

Nach 5 Minuten Bebrütung im H_2O Bad bei 25° C wurden

5. 0,05 ml G-6-P in 10^{-3} M Konzentration bzw. in entsprechend B veränderten Konzentrationen hinzugefügt. Sodann wurde mit der Extinktionsmessung begonnen. Die Änderung der Extinktion bei 366 mμ pro Minute wurde im Eppendorf-Photometer über eine Zeitspanne von 10 Minuten gegen Aqua bidest gemessen und der Durchschnitt von ΔE ausgewertet.

Das Küvettenvolumen betrug 3,2 ml. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration in der Küvette.

Verwendete Abkürzungen und Trivialnamen:

DHEA = Δ 5-Androstenolon (3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on)

16α-OH-DHEA (3ß,16α-Dihydroxy-5-androsten-17-on)

Δ 4-Androstenolon (3ß-Hydroxy-4-androsten-17-on)

16-Keto-DHEA (3ß-Hydroxy-5-androsten-16,17-dion)

7ß-OH-DHEA (3ß,7ß-Dihydroxy-5-qndrosten-17-on)

7α-OH-DHEA (3ß,7α-Dihydroxy-5-androsten-17-on)

19-OH-DHEA (3ß,19-Dihydroxy-5-androsten-17-on)

3ß-Chlor-DHEA (3ß-Chloro-3-androsten-17-on)

7-Keto-DHEA (3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion)

3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten-16-on

Androstendiol (5-Androsten-3ß,17ß-diol)

Androstentriol (5-Androsten-3ß,16α,17ß-triol)

Androstendion (4-Androsten-3,17-dion)

Ätiocholanolon (3α-Hydroxy-5ß-androstan-17-on)

Androsteron (3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on)

Testosteron (17ß-Hydroxy-4-androsten-3-on)

Oestron (3-Hydroxy-1,3,5-oestratrien-17-on)

Oestradiol (1,3,5-Oestratrien-3,17ß-diol)

Oestriol (1,3,5-Oestratrien-3,16α,17ß-triol)

Pregnenolon (3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-on)

21-OH-Pregnenolon (3ß,21-Dihydroxy-5-pregnen-20-on)

17α-OH-Pregnenolon (3ß,17α-Dihydroxy-5-pregnen-20-on)

17α,21-OH-Pregnenolon (3ß,17α,21-Trihydroxy-5-pregnen-20-on)

Pregnendiol	(5-Pregnen-3ß, 20α-diol)
Pregnendiol	(5-Pregnen-3ß, 20ß-diol)
Pregnentriol	(5-Pregnen-3ß, 17α,20α-triol)
Progesteron	(4-Pregnen-3,20-dion)

PPZ	-	Pentose-Phosphat-Zyklus
EDTA	-	Äthylendiamintetraacetat-dinatriumsalz
TÄA	-	Triäthanolamin
NADP	-	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	-	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduziert
G-6-P	-	Glucose-6-Phosphat
6-PG	-	Glukonsäure-6-Phosphat
G-6-PDG	-	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind aus den folgenden Tabellen 1-4 und den Abbildungen 4-10 zu entnehmen.

Die Hemmung der G-6-PDG durch Steroide ist dabei in Prozent angegeben (Abb. 4,9 und 10, Tab. 1). Ob es sich um eine kompetitive oder eine nicht-kompetitive Hemmung oder um eine Mischung von beiden handelt, konnte mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Diagrammes (13) bestimmt werden. Dazu wurden die reziproken Werte von ΔE gegen die reziproken, abnehmenden Konzentrationen von G-6-P bzw. NADP aufgetragen. Die geraden Linien, die sich im negativen Bereich der Abszisse treffen, drücken den nicht-kompetitiven Charakter dieser Hemmung aus (Abb. 5 und 6). Bei einer kompetitiven Inhibition würden diese Geraden auf einem Punkt der Ordinate zusammenfallen, bei einem Mischhemmungstyp in einem Punkt im linken, oberen Quadranten des Koordinatenkreuzes. Der Schnittpunkt mit der Abszisse entspricht der K_M G-6-P bzw. der K_M NADP. Tabelle 2 enthält diese Werte.

Eine weitere Möglichkeit, den Hemmtyp und gleichzeitig die Hemmkonstante K_i zu bestimmen, bietet die Methode von Hunter-Downs(21). Hier bildet man zunächst den Quotienten $1 \frac{\alpha}{1-\alpha}$ oder $i \frac{Vi}{V-Vi}$, wobei i = konstante Inhibitorkonzentration, Vi = ΔE in Gegenwart des Inhibitors, V= ΔE

in Abwesenheit des Inhibitors. Trägt man diesen Quotienten gegen die Substrat-Konzentration auf, so erhält man Parallelen zur Abszisse, die den nicht-kompetitiven Charakter der Hemmung kennzeichnen. Bei kompetitiver Hemmung hingegen würden die Geraden die Ordinate und Abszisse schneiden. Die Schnittpunkte der Parallelen mit der Ordinate entsprechen den Hemmkonstanten K_i der einzelnen Steroid-Inhibitoren (Abb.7 und 8, Tab. 2,3 und 4).

Hemmung der G-6-PDG in menschlichem Hirngewebe durch DHEA und seine Sulfokonjugate. ([G-6-P] = 5 x 10^{-4}M; [NADP] = 3 x 10^{-4}M).

Tabelle 1

Inhibitor	Hemmung bei einer Konzentration von 10^{-5}M [%]	10^{-6}M [%]	10^{-7}M [%]
freies DHEA	64	31	10
DHEA-Sulfat	6	3	1
DHEA-Sulfatid	83	42	19

Abbildung 4

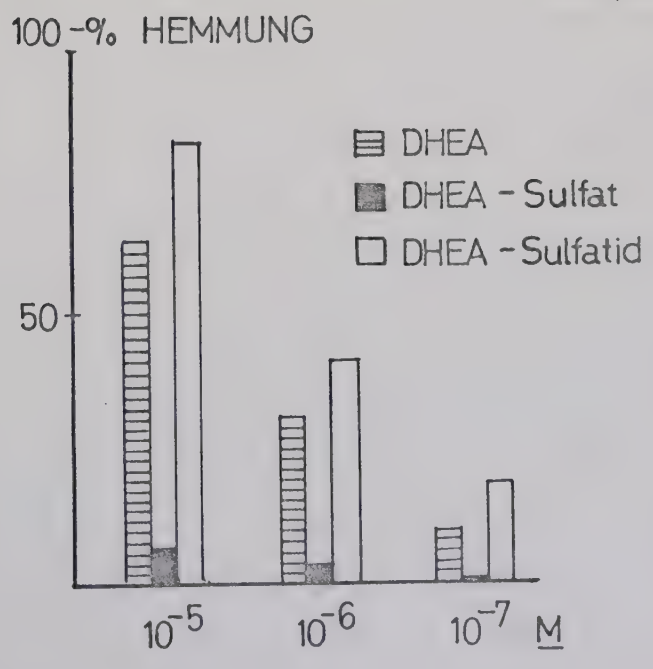


Tabelle 2: K_M-Werte für G-6-P bzw. NADP sowie K_i-Werte für DHEA-Sulfatid bzw. für freies DHEA und G-6-P bzw. NADP als Substrat.

K_M	G-6-P	5.1×10^{-5} M
	NADP	4.5×10^{-5} M
K_i	DHEA-Sulfatid	5.9×10^{-6} M (G-6-P)
		6.2×10^{-6} M (NADP)
K_i	freies DHEA	1.4×10^{-5} M (G-6-P)
		1.7×10^{-5} M (NADP)

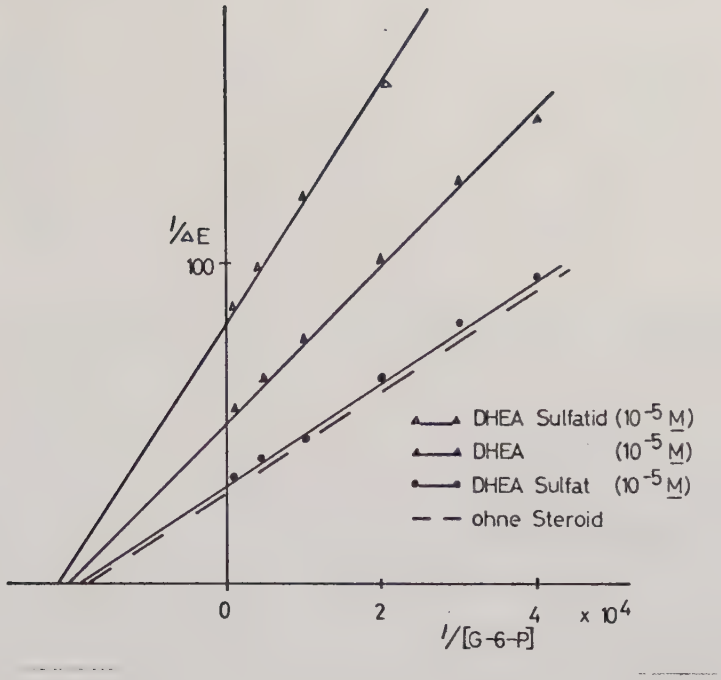


Abbildung 5: Diagramm nach Lineweaver-Burk mit G-6-P als Substrat.

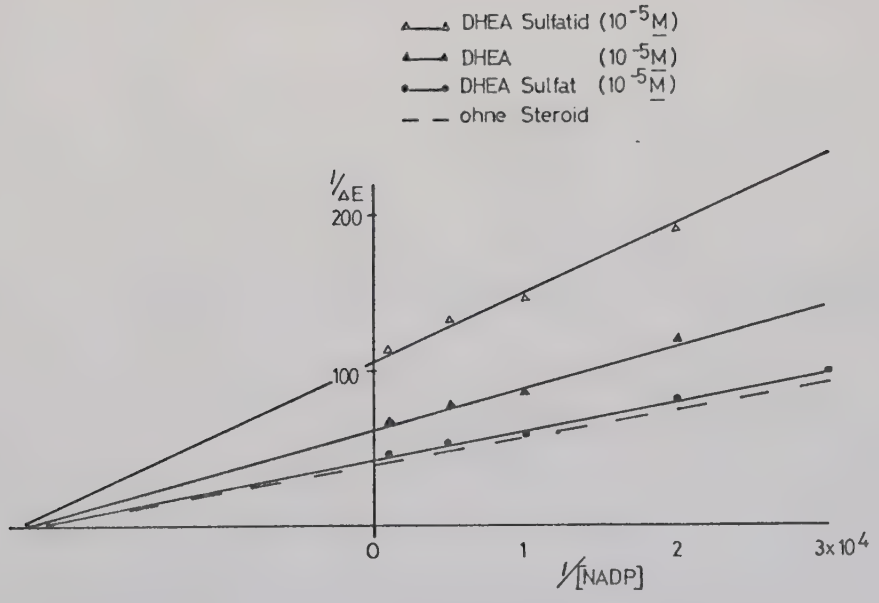


Abbildung 6: Diagramm nach Lineweaver-Burk mit NADP als Substrat.

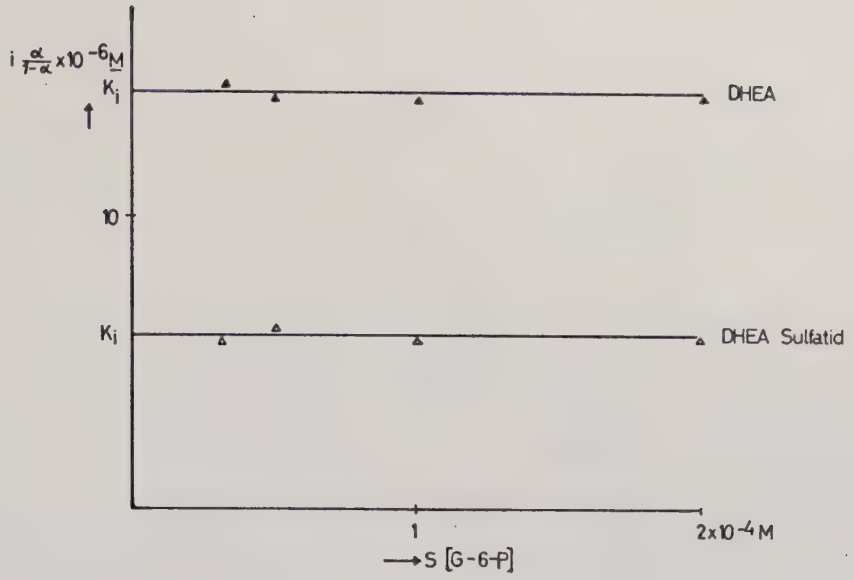


Abbildung 7: Diagramm nach Hunter-Downs mit G-6-P als Substrat.

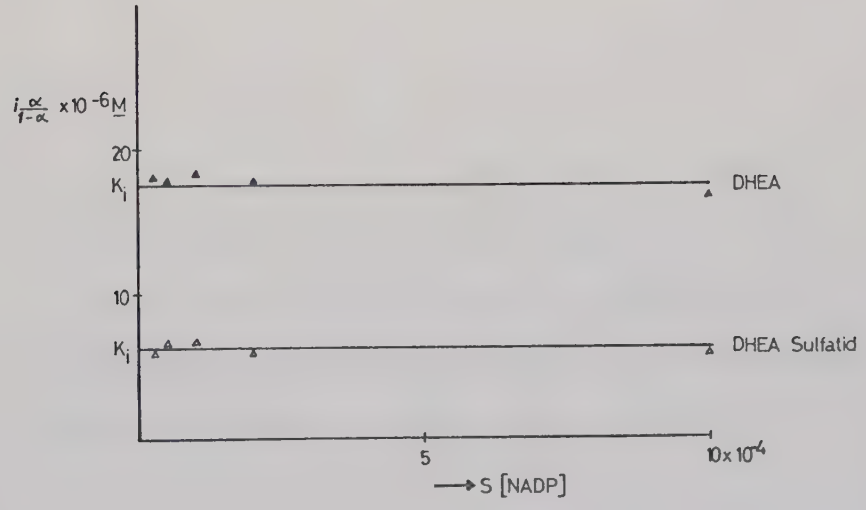


Abbildung 8: Diagramm nach Hunter-Downs mit NADP als Substrat.

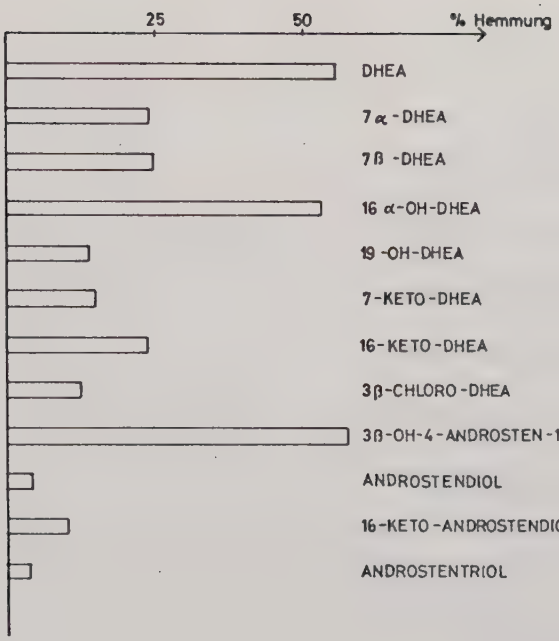


Abbildung 9: Hemmung der G-6-PDG in menschlicher Plazenta durch verschiedene C_{19}-Steroide.
([G-6-P] = 5×10^{-4}M; [NADP] = 3×10^{-4}M).
Konzentration der Steroide = 10^{-5}M

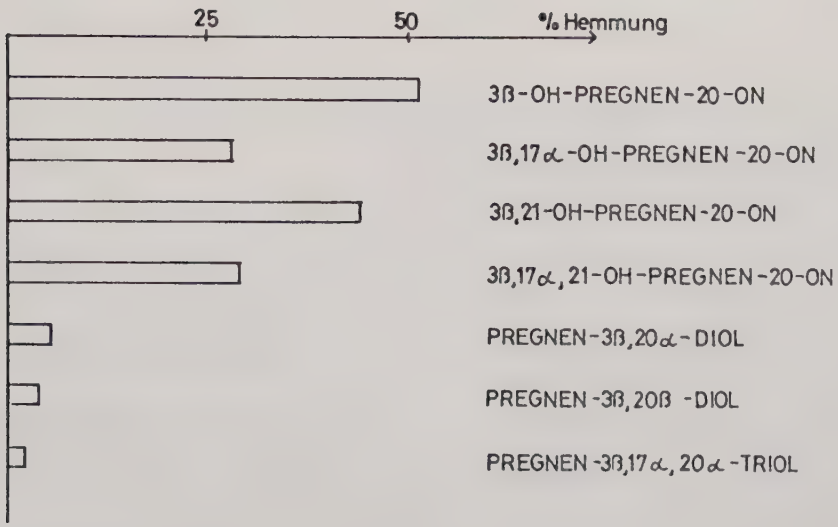


Abbildung 10: Hemmung der G-6-PDG in menschlicher Plazenta durch verschiedene C_{21}-Steroide.
([G-6-P] = 5 x 10^{-4}M; [NADP] = 3 x 10^{-4}M).
Konzentration der Steroide = 10^{-5}M

Tabelle 3: Hemmung von G-6-PDG aus menschlicher Plazenta durch verschiedene C-19-Steroide.

Steroid	K_i-Werte (für G-6-P)
3ß-Hydroxy-4-androsten-17-on	4.6×10^{-6} M
3ß-Hydroxy-5-androsten-17-on	6.9
3ß,16α-Dihydroxy-5-androsten-17-on	8.9
3ß-Hydroxy-5-androsten-16,17-dion	2.1×10^{-5}
3ß,7ß-Dihydroxy-5-androsten-17-on	2.3
3ß,7α-Dihydroxy-5-androsten-17-on	2.9
3ß,19-Dihydroxy-5-androsten-17-on	3.0
3ß-Chloro-5-androsten-17-on	3.1
3ß-Hydroxy-5-androsten-7,17-dion	6.0
3ß,17ß-Dihydroxy-5-androsten-16-on	8.2
5-Androsten-3ß,17ß-diol	2.5×10^{-4}
5-Androsten-3ß,16α,17ß-triol	3.7

Tabelle 4: Hemmung von G-6-PDG aus menschlicher Plazenta durch verschiedene C-21-Steroide

Steroid	K_i-Werte (für G-6-P)
3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-on	7.7×10^{-6} M
3ß,21-Dihydroxy-5-pregnen-20-on	1.1×10^{-5}
3ß,17α,21-Trihydroxy-5-pregnen-20-on	1.9
3ß,17α-Dihydroxy-5-pregnen-20-on	2.2
5-Pregnen-3ß,20α-diol	1.2×10^{-4}
5-Pregnen-3ß,20ß-diol	1.8
5-Pregnen-3ß,17α,20α-triol	5.6

Diskussion

Aus Abbildung 4 bzw. Tabelle 1 geht deutlich hervor, daß synthetisches DHEA-Sulfatid einen wirksamen Inhibitor der G-6-PDG im Hirngewebe darstellt und in seiner Wirkung das freie DHEA beträchtlich übertrifft. DHEA-Sulfat zeigte hingegen keinerlei oder nur eine äußerst geringe Hemmung, die auf eine gewisse Sulfatase-Aktivität der Enzympräparation hinweist. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit denen, wie sie mit G-6-PDG in Erythrozyten (39), sowie in Leber-, Ovarial- und Hodengewebe (31,40,41) gewonnen wurden. Geht man davon aus, daß im menschlichen Harn DHEA-Sulfat in hoher Konzentration anzutreffen ist (40) gegenüber geringen Mengen an freiem DHEA, so ist auffällig, daß dieses sulfokonjugierte Steroid praktisch keine Rolle spielt hinsichtlich einer Hemmung von G-6-PDG. Dieser "Unwirksamkeit" des DHEA-Sulfats steht der starke hemmende Einfluß des DHEA-Sulfatids gegenüber. Wenn man annimmt, daß das Sulfat sich im Organismus in Sulfatid umwandelt, und letzteres die eigentliche sulfokonjugierte "Funktionsform" des Dehydroepiandrosterons ist (35,36,51), dann läßt sich die anfängliche Diskrepanz bisheriger Untersuchungsergeb-

nisse ohne weiteres erklären. Für diese Vorstellung spricht weiter, daß DHEA-Sulfatid selbst in einer 10^{-7}M Konzentration, mithin in einer Konzentration, die im physiologischen Rahmen liegt, noch eine deutliche Hemmung verursacht. Dies im Gegensatz zu freiem DHEA, das im Organismus nur eine nahezu 10^{-7}M Konzentration erreicht und wie aus Abbildung 4 bzw. Tabelle 1 ersichtlich, in dieser Konzentration nur noch eine geringe Inhibition erkennen läßt. Sicherlich ist neben einer spezifischen Wirksamkeit des konjugierten Steroids durch Anlagerung an das Enzym vor allem der lipophile Charakter des Sulfatids von Bedeutung. Dieser gibt dem Molekül die Möglichkeit, lipoidhaltige Membranen zu penetrieren. Daß Membranprobleme dieser Art zu berücksichtigen sind, geht aus Versuchen von ROBERTS, BANDY und LIEBERMANN (43) hervor, die bei Inkubationen von intakten Mitochondrien mit Cholesterin-Sulfat keinen Metabolismus feststellen konnten. Nach der Zerstörung der Mitochondrien-Membranen bemerkte man einen beachtlichen Abbau der Steroid-Konjugate.

SONKA und Mitarbeiter (45) haben sich besonders mit den Beziehungen zwischen DHEA und G-6-PDG beschäftigt. Klinisch prüften sie das Bild des DHEA-Mangelsyn-

droms, das im wesentlichen durch ein beeinträchtigtes NADP-NADPH-System bedingt ist. Da durch Fehlen an DHEA die G-6-PDG nicht genügend gehemmt wird, kommt es zu vermehrter Bildung von NADPH und damit zur Auslösung einer Folge von Krankheitssymptomen. Abbildung 2 veranschaulicht die Hauptstätten des NADPH-Verbrauchs. Man erkennt hieraus, daß die Fettsäuresynthese sowie die Entstehung verschiedener Lipoide an die Anwesenheit von NADPH geknüpft ist. Durch DHEA-Mangel kann es also zu beschleunigter Liposynthese und Fettsucht kommen. Daß manche Form der Fettsucht auf diese Weise entstehen kann, unterstützen auch andere Autoren (7,27). LOPEZ und KREHL (27) fanden sogar einen Anstieg des DHEA im Harn fettsüchtiger Patienten während Abmagerungskuren. Die Autoren glauben nicht, daß ihre Feststellung als Folge der abgeänderten Kost zu werten ist. Die Abspaltung der Seitenkette am Cholesterin und somit die Umwandlung in Pregnenolon ist ebenfalls an NADPH gebunden. Da bei der Interkonversion der Steroide, die noch andere NADPH-abhängige Reaktionen aufweist, unter anderem auch DHEA entsteht, liegt eine Art von Feedback-Mechanismus vor. Ein Zusammenhang zwischen Fettsucht und Steroiddisbalanz ist bekannt und zeigt sich bei Frauen mit Hypo- oder Amenorrhoe

oder Sterilität, während bei Männern an Hypogonadismus und Morbus Fröhlich erinnert sei.

NADPH bewirkt außerdem die Spaltung von Disulfid-Brücken und konserviert so SH-Gruppen in ihrer reduzierten Form. Während dadurch einige Enzyme ihre Aktivität behalten, führt die Spaltung der Disulfid-Brücke beim Insulin zur Inaktivierung des Hormons und letztenendes zu einer Art des Diabetes mellitus. Ähnliche Mechanismen gelten sowohl für die Funktion der γ-Globuline wie für das Adiuretin.

Außer diesen Folgeerscheinungen sehen SONKA und Mitarbeiter (45) Beziehungen zwischen DHEA-Mangel und beschleunigter Blutgerinnung mit dem klinischen Bild der Thrombose.

Da bei Psoriatikern der Pentose-Phosphat-Zyklus verstärkt in Anspruch genommen wird, lag es nahe, auch dieses Krankheitsbild mit einer verminderten DHEA-Produktion in Zusammenhang zu bringen. Neuere Arbeiten von HOLZMANN und Mitarbeitern (20) scheinen diese Vermutungen teilweise zu bestätigen.

Betrachtet man zusätzlich zu Abbildung 4 die Abbildungen 9 und 10, so erkennt man, daß neben dem DHEA-Sulfatid und dem freien DHEA vor allem 16-OH-DHEA, Δ 4-Androstenolon sowie Pregnenolon zu den stärksten Hemmern der hier untersuchten Steroide zu rechnen sind.

16-OH-DHEA gewinnt in letzter Zeit immer mehr an Interesse, da es in der plazento-fetalen Einheit eine wichtige Zwischenstufe bei der Oestriol-Biosynthese darstellen dürfte (12). Es könnte somit in Verbindung mit DHEA und Pregnenolon einen gewissen Einfluß auf die G-6-PDG während der Gravidität ausüben. BEACONSFIELD und MORRIS (4) glauben, daß durch die progressive Vermehrung von gewissen Steroiden mit Hemmwirkung während der Schwangerschaft eine Art Feedback-Mechanismus entsteht, der vielleicht als eine der Ursachen für das Einsetzen der Wehen gelten kann. Dieselben Autoren fanden in ihren Studien einen verstärkten Pentose-Phosphat-Zyklus der Plazenta im ersten Trimester, der dann allmählich absank. Störungen des Feedback-Mechanismus bzw. des Pentose-Phosphat-Zyklus könnten ihrer Meinung nach daher besonders geeignet sein, Fehlgeburten auszulösen. In Tierversuchen ließ sich nachweisen, daß durch eine Beeinträchtigung des Pentose-Phosphat-Zyklus und des daraus resul-

tierenden Mangels an Pentosen eine Verringerung der Protein-Synthese und der Zellvermehrung entstand. Da nicht nur die Plazenta sondern auch der Fetus zu den am schnellsten wachsenden animalischen Geweben zählt, ist es verständlich, daß durch die gleichen Störfaktoren die Lebensfähigkeit des Kindes bedroht ist.(4).

Die Bedeutung des Pregnenolons wird gekennzeichnet durch seine zentrale Stellung im Steroid-Stoffwechsel. Es gilt als die Ausgangssubstanz für Androgene und Oestrogene sowie für Corticoide.

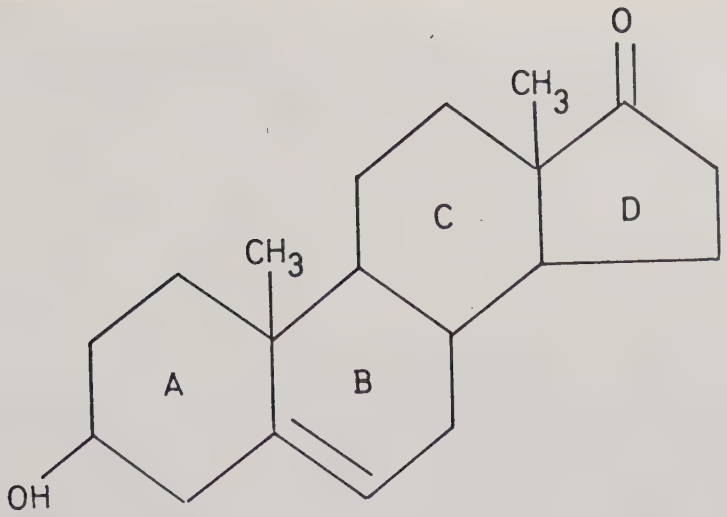
BETZ und WARREN (5) konnten den hemmenden Einfluß von DHEA und Pregnenolon gegenüber plazentarer G-6-PDG ebenfalls nachweisen. Weniger wirksam zeigte sich in ihren Studien Oestradiol, wobei Unterschiede zwischen den 17α - und 17ß-Epimeren bestanden. So wichtige Hormone aber wie Testosteron und Oestriol besaßen hingegen keinerlei Hemmwirkung, ebensowenig wie Progesteron.

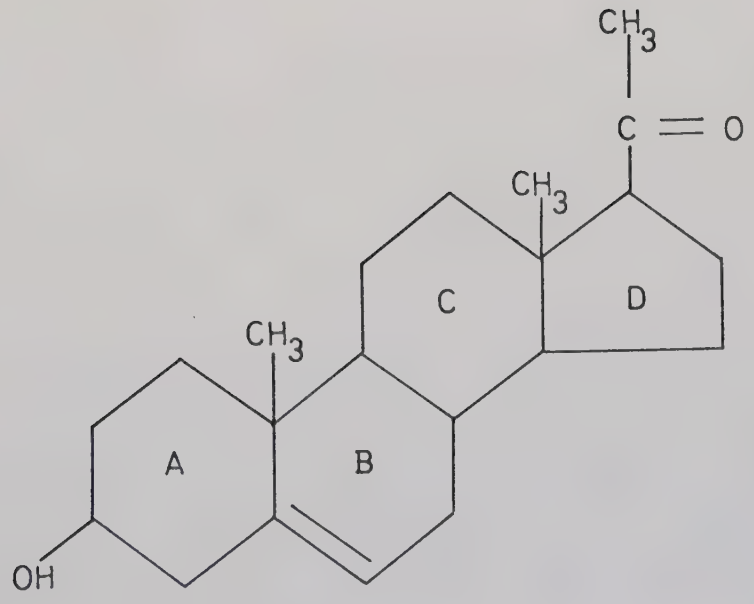
Es sei hier noch erwähnt, daß nach Verabreichung des Ovulationshemmers Lyndiol (Lynestrenol und Mestranol) am Rattenovar eine statistisch signifikante Abnahme der G-6-PDG-Aktivität zu verzeichnen war (44). Cyclusabhängige Schwankungen dieser Enzym-Aktivität wurden ferner im Ratten-

ovar beobachtet (44).

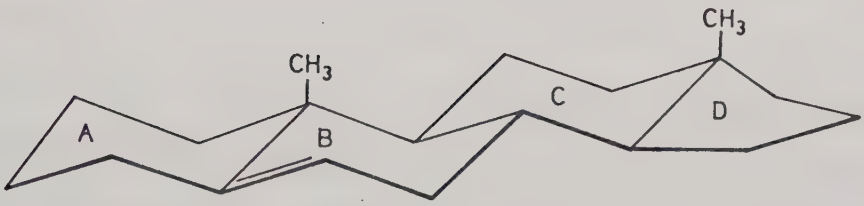
Aus den Abbildungen 5 und 6, die das Lineweaver-Burke-Diagramm zeigen, sowie den Abbildungen 7 und 8, die gemäß der Hunter-Downs'schen Gleichung angefertigt wurden, ist zu ersehen, daß es sich bei der untersuchten Hemmung um eine nicht-kompetitive handelt. Die hier untersuchten Steroide werden soweit sie einen hemmenden Einfluß besitzen, nicht durch einfache Erhöhung der Substrat-Konzentration von Enzymmolekül verdrängt. Die Anlagerung des Steroids an das Enzym erfolgt an anderer Stelle als die des Substrats. Offensichtlich werden durch diese Anlagerung aber die aktiven Zentren des Enzyms verhindert, mit dem Substrat den Enzym-Substrat-Komplex zu bilden oder aber die Spaltung eines noch hypothetischen Inhibitor-Enzym-Substrat-Komplexes unterbleibt. In den Tabellen 2-4 sind die Inhibitions-Konstanten (K_i) der einzelnen untersuchten Steroide aufgeführt. Die niedrigen Hemmkonstanten zeigen dabei die hohe Affinität des betreffenden Steroids zur G-6-PDG.

Anhand der untersuchten Steroide und ihrer Hemmwirkung lassen sich gewisse Schlüsse auf Zusammenhänge zwischen Struktur und biologischer Aktivität ziehen. Um das Verständnis zu erleichtern, sei die Strukturformel eines C_{19}-, bzw. C_{21}-Steroids aufgezeichnet (Abb. 11 u. 12).


O
CH3
C
D
CH3
A
B
OH


CH3
C = O
CH3
C
D
CH3
A
B
OH

Der räumlichen Anordnung entspricht eher die untere Abbildung 13, welche die sogenannte Sesselform des Moleküls erkennen läßt (9,15,52).



Betrachtet man nun die am stärksten hemmenden Steroide aus der C-19-Reihe also DHEA und 16-OH-DHEA, so stellt man fest, daß sie eine 3ß-OH-Gruppe, eine 17-Keto-Gruppe und die Δ 5-Doppelbindung gemeinsam haben. Zu den besten

Hemmern unter den C_{21}- Steroiden zählen Pregnenolon und 21-Hydroxy-Pregnenolon. Auch diese beiden Steroide besitzen eine 3ß-OH-Gruppe, sowie eine Δ 5-Doppelbindung. Unterschiedlich ist lediglich die Stellung der Keto-Gruppe, die hier an C-20 liegt. Vergleicht man die bisher erwähnten Steroide hinsichtlich ihrer Struktur, so erkennt man, daß die Einführung einer Hydroxyl-Gruppe an C-16 oder an C-21 wie im Falle des 16 α-OH-DHEA bzw. des 21-OH-Pregnenolon nur eine geringe Verminderung der Hemmaktivität bewirkt. Bezieht man in diese Betrachtung weitere Steroide mit einem veränderten Ring D ein, so stellt man fest, daß zwar eine zusätzliche Hydroxyl-Gruppe an C-17 des Pregnenolons die Hemmwirkung weiterhin verschlechtert, nicht aber aufhebt. Dasselbe gilt für die weitere Hydroxylierung des 21-Hydroxy-Pregnenolons zu 17α-21-Dihydroxy-Pregnenolon. Man kann daraus ersehen, daß jede weitere Hydroxylierung des Pregnenolons mit einer Abnahme der Hemmwirkung einhergeht. Auch die Einführung einer zusätzlichen Keto-Gruppe an C-16 wie beim 16-Keto-Androstendiol verschlechtert den Inhibitionseffekt. Werden aber die 17- oder 20-Keto-Gruppen reduziert, so resultiert daraus ein praktisch vollständiger Verlust der Hemmeigenschaften. Als Beispiel hierfür seien Androstendiol, Androstentriol, Pregnendiol und Pregnentriol genannt. Hiermit scheint die

Bedeutung der C-17- bzw. der C-20-Keto-Gruppe für die Hemmung der G-6-PDG klar erwiesen.

Welche Bedeutung besitzt die Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 für die Hemmwirkung solcher Steroide? Anhand der hier untersuchten Steroide läßt sich feststellen, daß die Δ 5-Doppelbindung für die Hemmung nicht obligat ist, denn die Verlagerung der Doppelbindung von C-5-(6) nach C-4- (5) bringt im Falle des Δ4-Androstenolons keinen Verlust der Hemmaktivität mit sich. Diese Erkenntnis beinhaltet eine weitere Frage: Ist überhaupt eine Doppelbindung notwendig? Auf Grund der von MARKS und BANKS (28) gewonnenen Ergebnisse muß dies verneint werden. Konnten doch diese Autoren auch eine Hemmung der G-6-PDG von Erythrozyten durch Ätiocholanolon und Androsteron nachweisen, die allerdings bedeutend geringer war als die von DHEA bzw. Pregnenolon. Hingegen fanden BETZ und WARREN (5) mit Androsteron keine Hemmwirkung auf die G-6-PDG von Plazentagewebe. Wenn auch hier unterschiedliche Ergebnisse vorliegen, die sich vielleicht mit einer Gewebsspezifität erklären lassen, so wird doch ersichtlich, daß die planare Konfiguration in unserem Falle die günstigere Struktureinheit darstellt, wobei die Verlagerung der Doppelbindung von Ring B nach Ring A einen Abfall der Aktivität im Hemmtest nach sich zieht. Daß die Doppelbindung eine

gewisse Bedeutung besitzt, geht aus der Tatsache hervor, daß eine Substitution an C-7 wie beim 7α bzw. 7ß-OH-DHEA eine Verminderung der Hemmwirkung hervorruft. Unter Heranziehung unserer Ergebnisse sowie der anderer Autoren (5,28) wird deutlich, daß die Doppelbindung an C-4 oder C-5 nur im Zusammenhang mit der OH-Gruppe am C-3-Atom eine Wirkung entfaltet. Befindet sich an C-3 hingegen eine Keto-Gruppe, so scheint die Hemmwirkung aufgehoben zu sein. Beispiele sind hierfür 3-Keto- Δ 4-Steroide wie Testosteron und Progesteron.

Ersetzt man die 3ß-Hydroxylgruppe durch ein 3ß-Chlor, so ist die Aktivität des Steroids im Hemmtest nahezu aufgehoben. Das hier untersuchte 3ß-Chlor-DHEA ist hierfür ein gutes Beispiel. Unter diesem Aspekt erscheint es zunächst nicht verwunderlich, daß DHEA-Sulfat oder -Glucuronosid keine Hemmung verursachen, da beide bekanntlich Anionen darstellen und extrem wasserlöslich sind. Die Veresterung von DHEA mit Sulfatid-Säure führt dagegen zu einer lipophilen Verbindung, die immer noch eine Sauerstoff-Funktion mit freien Elektronenpaaren besitzt.

Da zur Zeit noch keine exakten Ergebnisse über die Struktur der G-6-PDG vorliegen, können auf Grund der in dieser Arbeit gewonnenen Einsichten nur spekulative Erwä-

gungen gezogen werden bezüglich der Anlagerung des Steroids an das Enzym.

Nach dem bisher Gesagten jedoch scheinen hinsichtlich des Inhibitor-Effekts auf die G-6-PDG drei struktuelle Bedingungen des Steranmoleküls von besonderer Wichtigkeit zu sein: nämlich eine 3ß-Hydroxy-Gruppe, eine Keto-Gruppe an C-17 oder C-20 und eine planare Konfiguration in C-4 bis C-7. Während chemische Reaktionen eher von der Unterseite des Steroids erfolgen, da die beiden Methylgruppen am C-18 und C-19 ein sterisches Hindernis darstellen (15), scheint im Falle der Anlagerung des Steroids an das Enzym auch die Oberseite des Moleküls eine Rolle zu spielen. Dies wird deutlich bei Betrachtung von 19-OH-DHEA, wo der Hydroxylierung an C-19 des Dehydroepiandrosterons eine starke Verminderung der Hemmwirkung folgte. Aus derselben Tatsache heraus ließe sich verstehen, warum 16α-OH-DHEA ein fast genauso starker Inhibitor ist wie DHEA selbst.

Ein weiterer Hinweis für die Richtigkeit der bisher angenommenen Vorstellungen geben Struktur und Inhibitionsstärke der Oestrogene. Aus den Ergebnissen von MARKS und BANKS (28) sowie von BETZ und WARREN (5) ist zu entnehmen, daß Oestron ein nicht-kompetitiver Hemmer der G-6-PDG ist, Oestradiol und Oestriol dagegen sind in physio-

logischer Konzentration als Inhibitoren unwirksam. Während aber 17α-Oestradiol unter gewissen Umständen noch eine gewisse Hemmung zeigen kann (BETZ und WARREN) (5), fehlt die Hemmwirkung bei 17ß-Oestradiol fast vollständig. Betrachtet man die Strukturformeln dieser C-18-Steroide, so entdeckt man, daß Oestron neben der 3-OH- auch eine 17-Keto-Gruppe enthält sowie Doppelbindungen in Ring A. Oestradiol und Oestriol hingegen besitzen keine Keto-Gruppe in C-17, die wie oben erwähnt, für eine ausreichende Inhibition notwendig wäre.

Die unterschiedlichen Ergebnisse, die in der Literatur hinsichtlich der Hemmung der G-6-PDG durch Steroide gefunden wurden, können vielleicht mit spezifischen Unterschieden der G-6-PDG in verschiedenen Zellgeweben erklärt werden. Wahrscheinlicher ist aber, daß diese Unterschiede auf differenten Aufarbeitungsmethoden der einzelnen Untersucher beruhen. Dabei sind nicht nur veränderte Konzentrationen der benutzten Reagentien sondern vor allem auch der Reinheitsgrad des Enzyms in Erwägung zu ziehen. Ist es doch durchaus möglich, daß außer der angereicherten G-6-PDG noch andere Enzyme im Extrakt vorhanden sind, die che-

mische Änderungen am Steroid verursachen und Metaboliten entstehen lassen. So wäre es denkbar und erklärlich, daß zum Beispiel ein an sich nicht-hemmendes Steroid metabolisch in ein Derivat verwandelt wird, das zur Inhibition fähig ist. Für diese Annahme sprechen auch Befunde, die OERTEL und Mitarbeiter (31,39-41) bei Inkubation von gereinigter G-6-PDG mit radiomarkierten Steroiden machten. Sie konnten dabei einen deutlichen, wenngleich geringen Metabolismus des eingesetzten Dehydroepiandrosterons feststellen. Von diesem Gesichtspunkt aus gesehen, müssen vor allem die Steroide, die nur eine ganz minimale Inhibition aufweisen, besonders kritisch begutachtet werden.

Es scheint sicher, daß die Affinität zwischen Enzym und Hemmer auf elektrostatischer oder Van der Waals'scher Kraft beruht. Eine solche Betrachtung aber bleibt heute noch lückenhaft und unvollständig, so lange die Struktur der G-6-PDG nicht bekannt ist. Aus derselben Ursache heraus kann auch kein Rückschluß auf den Mechanismus der nicht-kompetitiven Hemmung durch Steroide gezogen werden. Werden durch die Anlagerung des Inhibitors die aktiven Zentren des Enzyms, die normalerweise mit dem entsprechenden Substrat reagieren, blockiert oder kommt es zu einer räumlichen Strukturänderung des Enzyms, so daß der "Schlüssel nicht mehr ins Schloß paßt?"

Zusammenfassend kann gefolgert werden, daß G-6-PDG aus Hirn gleichfalls durch DHEA, insbesondere aber durch DHEA-Sulfatid gehemmt werden kann. Es handelt sich dabei um eine nicht kompetitive Inhibition. Betrachtet man anhand zahlreicher C_{19}-, C_{21}-Steroide die Struktur, die für eine Hemmung des Enzyms notwendig ist, so kommt man zu dem Ergebnis, daß wahrscheinlich drei Stellen im Steroidmolekül von Wichtigkeit sind: Dies ist einmal die Keto-Gruppe am C-17 oder C-20, weiter die 3ß-Hydroxyl-Gruppe sowie die Konfiguration zwischen C-4 und C-7.

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, daß G-6-PDG, die aus menschlichem Hirngewebe isoliert wurde, durch DHEA und insbesondere durch das lipophile DHEA-Sulfatid gehemmt wird. DHEA-Sulfat hingegen bewirkte nur eine minimale Inhibition. Die Art der Hemmung ist nicht-kompetitiv. Weiterhin wurden zahlreiche C_{19}-, C_{21}- Steroide hinsichtlich ihrer Hemmwirkung auf gereinigte G-6-PDG aus menschlicher Plazenta untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß wahrscheinlich drei Bezirke des Steroid-Moleküls für die Inhibition von Bedeutung sind: Die C-17- bzw. C-20-Keto-Gruppe, die 3ß-Hydroxyl-Gruppe sowie die Konfiguration zwischen C-4 bis C-7.

LITERATUR

1. ABDERHALDEN,R. — Klinische Enzymologie. Die Fermente in der Pathogenese, Diagnostik und Therapie. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1958)

2. AMMON,R. und W.DISCHERL — Fermente, Hormone, Vitamine und die Beziehung dieser Wirkstoffe zueinander. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart Band I und II (1959)

3. BAULIEU,E.E. C.CORPECHOT F.DRAY R.EMILIOZZI M.C.LEBEAU P.MAUVAIS und P.ROBEL — An adrenal-secreted "androgen": dehydroepiandrosterone-sulfate. Its metabolism and a tentative generalization on the metabolism of other steroid conjugates in man. Recent Progr.Hormone Res. 21, 411-450 (1967)

4. BEACONSFIELD,P. und MORRIS,N. — Der Glukosestoffwechsel im plazento-fetalen Verband. Münch.Med.Wschr. 38, 1945-9 (1967)

5. BETZ,G. und WARREN,J.C. — Studies with G-6-PDG from human placenta. Acta endocr. 49, 47-57 (1965)

6. BLUM,K.U. und A.SCHOLZ — Erythrozytäre G-6-PDH-Aktivität und Schilddrüsenfunktion Klin.Wschr. 10, 516-19 (1967)

7. BRANDAU,H. und W.LUH — Der Einfluß von Steroidhormonen auf die Glukoseoxydation Geburtsh. und Frauenheilk. 28, 1074-75 (1968)

8. BURSTEIN,S. und R.I.DORFMAN — Biosythesis of C-19-steroids from 4-^{14}C-cholesterol and 7-^{3}H-pregnenolone in vivo: consideration of new pathways Acta endocr. 40, 188-202 (1962)

9. CARLSON,P. — Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1961

10. CARSON,P.E. C.L.FLANAGAN C.E.ICKES und A.S.ALVING — Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes Science 124, 484-485 (1956)

11. DERN,R.J. M.F.GLYNN und G.BREWER — Studies on the correlation of the genetically determined trait, G-6-PDG-deficiency with behavioral manifestations in schizophrenia J.lab.clin.Med. 62, 319-29 (1963)

12. DICZFALUSY,E. — Kongreß: Dtsch.Gesellsch. für Endokrinologie, Ulm 1970

13. DIXON,M. und E.C.WEBB
Enzymes
Longmans Green + Co, ltd. London 1967
2nd edition

14. FAZEKAS,I.G. und A.T.FAZEKAS
Die Corticosteroid-Fraktionen des menschlichen Gehirns
Endokrinologie 51, 183-210 (1967)

15. FIESER,L. und M.FIESER
Steroide
Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße (1961)

16. GRASSMANN,W.
Physiologische Chemie, ein Lehr- und Handbuch I.Herausgeber FLASCHENTRÄGER,B.
Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1951)

17. GRIGNANI,F. D.CORNICCHI und C.MAXIA
Auftreten der G-6-PDG-Aktivität in Erythrozyten mit Mangel an diesem Enzym durch Inkubation des Haemolysates mit Stromata von normalen roten Blutkörperchen
Klin.Wschr. 38, 1171-72 (1960)

18. GUAL,C. A.L.LEMUS M.GUT und R.I.DORFMAN
Biosynthesis of dehydroepiandrosterone in a patient with a virilizing adenoma
J.clin.Endocr. 22, 1193-95 (1962)

19. HOLLMANN,S.
Nicht-glykolytische Stoffwechselwege der Glukose
Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1961)

13. DIXON,M. und E.C.WEBB
Enzymes
Longmans Green + Co, ltd. London 1967
2nd edition

14. FAZEKAS,I.G. und A.T.FAZEKAS
Die Corticosteroid-Fraktionen des menschlichen Gehirns
Endokrinologie 51, 183-210 (1967)

15. FIESER,L. und M.FIESER
Steroide
Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße (1961)

16. GRASSMANN,W.
Physiologische Chemie, ein Lehr- und Handbuch I.Herausgeber FLASCHENTRÄGER,B.
Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1951)

17. GRIGNANI,F. D.CORNICCHI und C.MAXIA
Auftreten der G-6-PDG-Aktivität in Erythrozyten mit Mangel an diesem Enzym durch Inkubation des Haemolysates mit Stromata von normalen roten Blutkörperchen
Klin.Wschr. 38, 1171-72 (1960)

18. GUAL,C. A.L.LEMUS M.GUT und R.I.DORFMAN
Biosynthesis of dehydroepiandrosterone in a patient with a virilizing adenoma
J.clin.Endocr. 22, 1193-95 (1962)

19. HOLLMANN,S.
Nicht-glykolytische Stoffwechselwege der Glukose
Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1961)

20. HOLZMANN,H.
B.MORSCHES
R.GEBHARDT
G.HOFFMANN
P.MENZEL und
G.W.OERTEL
Untersuchungen zum DHEA-Gehalt im Plasma von Psoriatikern
im Druck

21. HUNTER,A. und
DOWNS,C.E.
Zitiert nach 13.

22. KNAPSTEIN,P.
A.DAVID
W.U.CHUNGHSIU
D.F.ARCHER
G.L.FLICKINGER und
J.C.TOUCHSTONE
Metabolism of free and sulfoconjugated DHEA in brain tissue in vivo and in vitro
Steroids 11, 885-896 (1968)

23. LARIZZA,P.
P.BRUNETTI
F.GRIGNANI und
S.VENTURA
L'individualità bioenzimatica dell'eritrocito "fabico" sopra alcune anomalie biochemiche ed enzimatiche delle emazie ei pazienti affeti da favismo e nei laro familiari
Haematologica 43, 205-50 (1958)

24. LAUDAHN,G.
Moderne Enzymdiagnostik in der Klinik
Therap.Monat 10, 190 (1960)

25. LEVY,R.
The interaction of mammary G-6-PDG with pyridine nucleotides and 3ß-

hydroxy-androst-5-en-17 one
J.biol.Chem. 238, 775-784 (1963)

26. LÖHR,G.W. und H.D.WALLER
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Zwischenferment) aus BURGMAYER, H.U. (editor) Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie Gmbh, Weinheim/ Bergstraße 1962

27. LOPEZ,S.A. und W.A.KREHL
A possible interrelation between G-6-PDG and dehydroepiandrosterone in obesity
Lancet 2, 485-7 (1967)

28. MARKS,P.A. und J.BANKS
Inhibition of mammalian G-6-PDG by steroids
Proc.Nat.Acad.Sci. 46, 447-52 (1960)

29. MARKS,P.A. A.SZEINBERG und J.BANKS
Erythrocyte G-6-PDG of normal and mutant human subjects
J.biol.Chem. 236, 10-17 (1961)

30. Mc.KERNS,K.W.
in PINCUS,G. (editor) Rec.prog. horm.research Vol 15, Academic press, Inc. New York p. 418 (1959)

31. MENZEL,P. und G.W.OERTEL
Effects of DHEA and its conjugates upon the acticity of G-6-PDG IV. Inhibition of G-6-PDG in human testicular tissue
in press (1970)

32. MENZEL,P. M.GOBBERT und G.W.OERTEL
Effects of DHEA and its conjugates upon the activity of G-6-PDG V.Inhibition of G-6-PDG in human placenta in press 1970

33. MICHOT,F. und H.R.MARTI
Die klinische Bedeutung der G-6-PDG-Aktivität der Erythrozyten Schweiz.Med.Wschr. 43, 1450-52 (1965)

34. OERTEL,G.W.
Steroide im Plasma. Synthese von Sulfatidyl-Dehydroepiandrosteron Naturwissenschaft 47, 91 (1961)

35. OERTEL,G.W.
Biosynthese eines lipophilen DHEA-Konjugates Biochem.Z. 339, 125-134 (1963)

36. OERTEL,G.W.und K.GROOT
In-vivo-Biogenese von C-19-Steroid-Sulfatiden Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 341, 204-214 (1965)

37. OERTEL,G.W.
Über Steroid-Konjugate in Plasma, XVII. Isolierung und Charakterisierung lipophiler Steroid-Konjugate aus Nebennierenrinden-Gewebe, Plasma und Liquor Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 343, 276-281 (1966)

38. OERTEL,G.W.
Die Bildung von Steroidhormonen in der Nebennierenrinde, den Ovarien und den Hoden

Therapiewoche 17, 1-4 (1968)

39. OERTEL,G.W. und I.REBELEIN
Effects of DHEA and its conjugates upon the activity of G-6-PDG in human erythrocytes
Biochim.Biophys.Acta 27, 459-460 (1970)

40. OERTEL,G.W. P.MENZEL und D.BAUKE
Effects of DHEA and its conjugates upon the activity of G-6-PDG
Clin.Chim.Acta 27, 197-201 (1970)

41. OERTEL,G.W. P.MENZEL und D.BAUKE
Effects of DHEA and its conjugates upon the activity of G-6-PDG. Inhibition of G-6-PDG in human ovarien tissue
Steroidologia, in press 1970

42. OERTEL,G.W. H.GUMBERT P.KNAPSTEIN und D.VOGT
C-19 and C-18 steroids in cerebrospinal fluid, plasma and urine after intravenous administration of 7α-^{3}H-DHEA-^{35}S-sulphate
Experientia 26, 192-193 (1970)

43. ROBERTS,K.D. L.BANDY und S.LIEBERMANN
The conversion of cholesterol-^{3}H-sulfate-^{35}S by somicated bovine adrenal mitochondria
Biochem.Biophys.Res.Commun. 29, 741-46 (1967)

44. SCHWARZKOPF,H. U.MOHR und H.IMMICH
Untersuchungen zur G-6-PDG-Aktivität am Ratten-Ovar nach Behandlung mit Lyndiol
Klin.Wschr. 47, 106 (1969)

45. SONKA,J.
I.GREGOROVA
M.JIRANEK
F.KÖLBEL und
Z.MATYS
Defekt des Dehydroepiandrosteron-
Ein neues Syndrom?
Endokrinologie 47, 152-161 (1965)

46. TOUCHSTONE,J.C.
J.E.GRIFFIN und
M.KASPAROW
Cortisol from human nerve
Science 141, 1275-76 (1963)

47. TOUCHSTONE,J.C.
M.KASPAROW und
P.A.HUGHES
Corticosteroids in human brain
Fed.Proc. 23, 2 (1964)

48. TOUCHSTONE,J.C.
M.KASPAROW
P.A.HUGHES und
M.R.HARWITZ
Corticosteroids in human brain
Steroids 7, 205-211 (1966)

49. WALLER,H.D.
G.W.LÖHR und
M.TABATABAI
Hämolyse und Fehlen von G-6-PDG
in roten Blutzellen
Klin.Wschr. 35, 1022-27 (1957)

50. WARBURG,O. und
W.CHRISTIAN
Über Aktivierung der Robisonschen
Hexose-Mono-Phosphorsäure in roten
Blutzellen und die Gewinnung akti-
vierender Fermentlösungen
Biochem.Z. 242, 206-227 (1931)

51. WEINAND,K.
RINDT,W. und
G.W.OERTEL
Biologische Halbwertszeiten von
C-21-Steroiden beim Meerschweinchen
Acta endocr. 52, 319-24 (1966)

52. Wissenschaftliche Tabellen "Documenta Geigy"
7.Auflage (1969) S.373-77

Für die Überlassung des Themas danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. med. W. RINDT.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. G.W. OERTEL, Leiter der Abteilung für experimentelle Endokrinologie in Mainz für die bereitwillige Unterstützung sowie für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

LEBENSLAUF

Am 21.5.1911 wurde ich als Tochter des 1931 verstorbenen Artur Pohl und seiner 1954 verstorbenen Ehefrau Wally Pohl geb. von Roskowski in Breslau geboren. Ich besitze die Deutsche Staatsangehörigkeit, bin evangelisch, seit 1948 geschieden und habe einen Sohn. Ostern 1931 machte ich am Reform-Realgymnasium des Katholischen Südlyzeums in Breslau das Abitur. Von 1931 bis 1937 studierte ich an der Friedrich-Wilhelm Universität zu Breslau Medizin, wo ich nach dem Sommersemester 1933 das Physikum und am 1.2.1937 das Staatsexamen machte. Nach Ableistung des Medizinalpraktikanten Jahres erhielt ich am 1.3.1938 die Bestallung als Ärztin. Danach arbeitete ich an verschiedenen Krankenhäusern und wurde während des Krieges von 1939-1945 als Vertretung von Allgemein-Praxen dienstverpflichtet. Im Januar 1945 Flucht aus Breslau nach Dänemark, wo ich als Lagerärztin bei deutschen Flüchtlingen tätig war. Nach der Rückkehr aus Dänemark im Mai 1945 Niederlassung als praktische Ärztin.